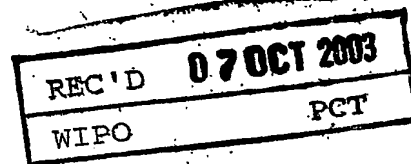


**ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT**

A-1200 Wien, Dresdner Straße 87

Kanzleigeühr € 20,00
Schriftengebühr € 78,00



15 SEP 2003

Aktenzeichen A 995/2002

Das Österreichische Patentamt bestätigt, dass

**die Firma IGENEON KREBS-IMMUNTHERAPIE FORSCHUNGS- UND
ENTWICKLUNGS-AG
in A-1230 Wien, Brunner Straße 59,**

am **3. Juli 2002** eine Patentanmeldung betreffend

**"Verwendung eines Präparates auf Basis eines Antikörpers gerichtet
gegen eine Tumor-assoziierte Glykosilierung",**

überreicht hat und dass die beigeheftete Beschreibung samt Zeichnung mit
der ursprünglichen, zugleich mit dieser Patentanmeldung überreichten
Beschreibung samt Zeichnung übereinstimmt.

Österreichisches Patentamt

Wien, am 2. Juli 2003

Der Präsident:

i. A.

**PRIORITY
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1 (a) OR (b)**HRNCIR**
Fachoberinspektor**BEST AVAILABLE COPY**

R 39960

(51) Int. Cl.:

AT PATENTSCHRIFT

(11) Nr.

(73) Patentinhaber:

IGENEON KREBS-IMMUNTHERAPIE
FORSCHUNGS- UND ENTWICKLUNGS AG
Wien (AT)

(54) Titel:

Verwendung eines Präparates auf Basis eines
Antikörpers gerichtet gegen eine Tumor-assoziierte
Glykosilierung

(61) Zusatz zu Patent Nr.

(66) Umwandlung von GM /

(62) gesonderte Anmeldung aus (Teilung): A

(30) Priorität(en):

(72) Erfinder:

(22) (21) Anmeldetag, Aktenzeichen: 03. JULI 2002 , A /

(60) Abhängigkeit:

(42) Beginn der Patentdauer:

Längste mögliche Dauer:

(45) Ausgabetag:

(56) Entgegenhaltungen, die für die Beurteilung der Patentierbarkeit in Betracht
gezogen wurden:

Die Erfindung betrifft eine neue Verwendung eines Antikörperpräparates, ein pharmazeutisches Präparat zur Behandlung von Krebspatienten sowie ein Verfahren zur Bestimmung oder Reduktion von Tumorzellen.

Der Rezeptor für epidermale Wachstumsfaktoren, genannt „epidermal growth factor“ (EGF) Rezeptor, ist ein Plasmamembran-Glycoprotein mit Tyrosin-Kinase Aktivität, welche durch Bindung an einen Liganden, etwa von EGF oder von Heregulin, aktiviert wird. Durch die Bindung der Wachstumsfaktoren wird die Dimerisierung und die Trans- oder Autophosphorylierung des Rezeptors hervorgerufen und damit eine Signalkaskade zur Zellteilung in Gang gesetzt. Nach Phosphorylierung wird die MAP-Kinase aktiviert. Diese Rezeptoren nehmen also als mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAP-Kinase) eine zentrale Stellung in der Regulierung des Zellwachstums und der Zellteilung ein. Die beiden Isoformen p42 und p44 der MAP-Kinase werden auch als erk1 und erk2 bezeichnet.

Die MAP-Kinase wird gerade von Tumorzellen unverhältnismäßig stark präsentiert, wodurch diese bzw. die EGF Rezeptoren als Tumor-assoziierte Antigene (TAA) gelten.

Tumor-assoziierte Antigene (TAA) sind oftmals Grundlage für die Entwicklung von immuntherapeutischen Mitteln zur Prophylaxe und/oder Behandlung von Krebs. TAA sind Strukturen, die bevorzugt auf der Zellmembran von Tumorzellen exprimiert sind, dadurch eine Unterscheidung zu nicht-malignem Gewebe ermöglichen und daher als Zielpunkte für diagnostische und therapeutische Anwendungen von spezifischen Antikörpern gesehen werden.

Das unkontrollierte Wachstums von Tumoren wird möglicherweise durch die Blockierung der MAP-Kinase verhindert. Im Stand der Technik werden eine Reihe von Antikörpern beschrieben, die spezifisch an die MAP-Kinase bzw. an EGF-Rezeptoren binden können.

In der EP 0 359 282 A werden monoklonale Antikörper beschrieben, die an die extrazelluläre Domäne des menschlichen EGF-Rezeptors binden. Dadurch soll das Zellwachstum von Tumorzellen inhibiert werden.

Ein Antikörper gerichtet gegen den „Epidermal Growth Factor“ Receptor-2 (HER-2) wurde auch in Kombination mit Chemotherapie eingesetzt (Anticancer Drugs 2001, 12 Suppl 4: S3-10).

Ein weiterer Antikörper, der an die Familie der EGF-Rezeptoren bindet, ist etwa in der US 5,811,098 beschrieben, wobei dieser Antikörper spezifisch an den HER4, ein humaner Tyrosinkinase - Rezeptor, binden.

Die WO 96/40210 A beschreibt chimäre oder humanisierte Varianten eines bestimmten anti-EGF-Rezeptor Antikörpers zur Inhibition des Tumorwachstums.

Die Blockierung der MAP-Kinase durch bestimmte Antikörper, die gegen die extrazelluläre Domäne der EGF-Rezeptoren gerichtet sind, hat den Nachteil, dass nicht nur Tumorzellen angegriffen werden, sondern jede mitotisch aktivierte Zelle.

Die Behandlung von Krebspatienten umfasst nicht nur die Verhinderung des Tumorwachstums, vielmehr soll die Bildung von Metastasen über einen längeren Zeitraum hinweg verhindert werden. Dies könnte nach Behandlung des Primärtumors durch Operation und/oder erfolgter Chemotherapie (bzw. Radiotherapie) indiziert sein. Disseminierte Tumorzellen können sich im Ruhezustand befinden und sind durch die Chemotherapie (Radiotherapie) oft nicht angreifbar. Ein derartig behandelter Patient befindet sich scheinbar in einem geheilten Zustand, welcher auch als „minimal residual disease“ beschrieben ist. Die ruhenden Tumorzellen haben ein Potential zu Metastasenbildung, wenn sie auch nach einem längeren Ruhezustand aufgrund eines Wachstumsstimulus zu metastasierenden Zellen werden.

Im Verlauf der Entdeckung und nachfolgenden Charakterisierung von verschiedensten TAA hat sich herausgestellt, dass diese wichtige Funktionen für Krebszellen haben. Sie ermöglichen den entarteten Zellen, charakteristische Eigenschaften für den malignen Phänotyp wie z.B. vermehrte Adhäsionsfähigkeit auszuüben, die für die Etablierung von Metastasen von großer Bedeutung sind. Allerdings können solche Antigene durchaus in bestimmten Stadien auch auf normalen Zellen exprimiert sein, wo sie für

normale Funktionen dieser Zellen verantwortlich sind. Ein Beispiel dafür ist das Lewis Y Kohlenhydratantigen, das auf der Mehrzahl der Tumoren epithelialen Ursprungs aufscheint, aber auch während der fötalen Entwicklung epithelialer Gewebe eine wichtige Rolle spielt. Es wurde gezeigt, dass die Expression dieses Antigens in Lungenkrebs stark mit einer ungünstigen Prognose assoziiert ist, da Lewis Y positive Krebszellen offensichtlich ein höheres metastatisches Potential haben (N. Engl. J. Med. 327 (1992), 14).

In der EP 0 528 767 A ist die Verwendung eines humanisierten anti-Lewis Y-Antikörpers zur Behandlung von epitheliale Kreb beschrieben.

Unter den weiter bekannten Tumor-assoziierte Kohlenhydratstrukturen finden sich z.B. alle Lewis-Antigene, die verstärkt in vielen epithelialen Krebsarten exprimiert werden. Dazu gehören Lewis x-, Lewis b- und Lewis y-Strukturen, sowie sialylierte Lewis x-Strukturen. Andere Kohlenhydrat-Antigene sind GloboH-Strukturen, KH1, Tn-Antigen, TF-Antigen, das alpha-1,3-Galactosyl-Epitop (Elektrophoresis (1999), 20:362; Curr. Pharmaceutical Design (2000), 6:485, Neoplasma (1996), 43:285).

Tumorzellen, die Sialyl-Le^a oder Di-sialyl Le^a exprimieren, können durch die Bindung an endothelialen Zellen mit Zelladhäsionsrezeptoren Metastasen bilden. Diese Bindung kann etwa gemäß der US 6121233 durch Inkubieren mit Kohlenhydratstrukturen, etwa mit Sialyl-Le^a oder Di-sialyl Le^a unterbunden werden.

In ähnlicher Weise wird gemäß der EP 0 521 692 das Metastasenbildungspotential von Tumorzellen inhibiert, wobei ein Mimik verabreicht wird, ausgesucht aus der Gruppe von Monosialosyl-Le I, Monosialosyl-Le II, Disialosyl-Le und Sialosyl Le.

Unter Verwendung verschiedener Tumorzellen konnte gezeigt werden, dass auch EGF-Rezeptoren ungewöhnliche Kohlenhydratstrukturen, also Kohlenhydrat-TAA, aufweisen, etwa den sialylierten Typ Le^x/Y (Cancer Research 47, 2531-2536, 1987).

Direkte therapeutische Anwendungen von Antikörpern gegen TAA

beruhen auf passiven Immuntherapien, das heißt, ein spezifischer Antikörper wird systemisch in geeigneter Menge an Krebspatienten verabreicht und übt eine immuntherapeutische Wirkung aus. Die biologische Halbwertszeit solcher Agentien hängt von ihrer Struktur ab und ist begrenzt. Daher ist es notwendig, wiederholte Applikationen vorzunehmen. Das kann bei Verwendung von xenogenen Antikörpern (z.B. murine monoklonale Antikörper, MAK) aber zu unerwünschten Immunreaktionen führen, die eine mögliche therapeutische Wirkung neutralisieren und gefährliche Nebenwirkungen (anaphylaktische Reaktionen) bedingen können. Daher können solche Immuntherapeutika nur für eine begrenzte Zeit verabreicht werden.

Eine bessere Verträglichkeit wird durch Reduktion der xenogenen Strukturen des Antikörpers und dem Einbau von menschlichen Strukturen erzielt, beispielsweise mit chimären oder humanisierten Antikörpern. Es werden auch Systeme zur Herstellung spezifischer humaner Antikörper entwickelt. So können bestimmte Zelllinien humane monoklonale Antikörper produzieren.

Die Erfindung stellt sich zur Aufgabe die Behandlung von Krebspatienten insofern zu verbessern, dass das Wachstum von Tumorzellen bzw. das Metastasenbildungspotential von Tumorzellen spezifisch unterdrückt wird.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch den Gegenstand der Ansprüche gelöst.

Erfindungsgemäß wird ein Präparat auf Basis eines Antikörpers gerichtet gegen eine Tumor-assoziierte Glykosilierung zur Herstellung eines Arzneimittels verwendet, zur prophylaktischen und/oder therapeutischen Behandlung zur Reduktion bzw. Inhibition des Wachstums von Tumorzellen in einem Krebspatienten. Die erfindungsgemäße Verwendung betrifft insbesondere die Behandlung von Patienten, die einer Chemotherapie unterzogen werden. Durch die Bindung der tumorspezifischen Antikörper an eine Tumorzelle, wird nicht nur die Tumorzell-Lyse möglich. Es werden auch die sämtliche Funktionen der Tumorzelle, die über glykosilierte Oberflächenrezeptoren ausgeübt werden, unterbunden. Eine Chemotherapie kann also in Kombination mit der erfindungsgemäßen

Verwendung wesentlich effektiver die Zelle angreifen. Dies wird vor allem für die Indikation einer Chemotherapieresistenz vorgeschlagen. In diesem Fall haben Tumorzellen Abwehrmechanismen entwickelt, die durch Oberflächenrezeptoren vermittelt werden. Eine weitere Indikation ist die „minimal residual disease“, für die disseminierte Tumorzellen angegriffen werden sollen.

Es hat sich überraschenderweise herausgestellt, dass die Oberflächenrezeptoren einer Tumorzelle mit einer aberranten Glykosilierung gezielt über Antikörper gegen diese Glykosilierung funktionell blockiert werden können. Dies betrifft nicht nur einen bestimmten Oberflächenrezeptor, wie den EGF-Rezeptor oder Her-2/neu Rezeptor. Es werden gleichsam alle Tumor - spezifischen Rezeptoren, die durch die aberrante Glykosilierung charakterisiert sind, gleichzeitig blockiert. Darunter sind etwa alle Rezeptoren der EGF-Rezeptorfamilie, der CD55 (791Tgp72/DAF - decay accelerating factor) - Rezeptor, der Transferrinrezeptor und das P-Glycoprotein. Die Tumorzelle wird damit aufgrund von verschiedenen Wirkmechanismen angegriffen.

Es hat sich überraschenderweise herausgestellt, dass Antikörper, die gegen eine aberrante Glykosilierung gerichtet sind, in funktioneller Weise an mehrer Rezeptoren der Familie der EGF-Rezeptoren binden und damit die Signalkaskade zur Induktion des Zellwachstums effektiv blockiert werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass insbesondere die erk1 und erk2 - Isoformen der MAP-Kinase funktionell durch die erfindungsgemäß verwendeten Antikörper gebunden werden können. Die Bindung der Wachstumsfaktoren an die Rezeptoren wurde dadurch verhindert bzw. reduziert. Diese Behandlung ist im Vergleich zur Immuntherapie mit Antikörpern gegen den proteinären extrazellulären Teil des EGF-Rezeptors spezifischer, da die ungewöhnlichen Tumor-assoziierten Kohlenhydratstrukturen auf EGF-Rezeptoren von normalen Zellen fehlen. Andererseits ist die Behandlung universeller, da gleichzeitig verschiedene Rezeptoren mit gleicher aberranter Glykosilierung blockiert werden.

Durch die erfindungsgemäße Verwendung wird erstmals ein Anti-Kohlenhydrat-Antikörper zur Immuntherapie und zur Inhibition von glykosilierten Tumorzell-Rezeptoren, insbesondere zur Verhinde-

rung der mitogenen Stimulierung einer Krebszelle durch EGF oder Heregulin zur Verfügung gestellt. Dabei soll die Mitose von normalen Zellen weitgehend ungestört verlaufen und entsprechende Nebenwirkungen verhindert werden. Die spezifische Bindung der Antikörper über eine Tumor-assoziierte Glykosilierung von Krebszellen an die Rezeptoren von Wachstumsfaktoren, blockiert deren Interaktion mit deren physiologischen Liganden und hemmt die Signaltransduktion durch diese Rezeptoren und damit das Zellwachstum. Diese Antikörper sind also kompetitiv funktionell wirksam.

Gleichzeitig kann ein solcher Antikörper durch seine Wirkung innerhalb des humoralen und zellulären Immunsystems die Tumorzelle spezifisch angreifen. Tumorzellen, die den EGF-Rezeptor bzw. Rezeptoren der EGF-Rezeptor Familie exprimieren, werden erfindungsgemäß spezifisch gebunden und können lysiert werden. Diese Funktionen des Antikörpers sind durch dessen ADCC- und CDC-Aktivität bestimmt (ADCC: antibody-dependent cellular cytotoxicity; CDC: complement dependent cytotoxicity), beides Aktivitäten, die mittels Standardtests bestimmt werden können. Mit diesen Funktionen hat die erfindungsgemäße Behandlung der Krebspatienten einen Vorteil gegenüber anderen kompetitiven Bindungspartnern, z.B. der im Stand der Technik bekannten Kohlenhydrat-Mimiks, die natürlich keine Antikörper-Aktivitäten aufweisen.

Erfindungsgemäß können sowohl Antikörper-Präparate zur Anwendung kommen, deren Wirkstoff sowohl die Funktion der kompetitiven Bindung als auch der Tumor-Zelllyse besitzen. Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft jedoch ein Präparat auf Basis eines modifizierten Antikörpers oder Antikörperderivates, der lediglich die MAP-Kinase blockiert und darüber hinaus keine lytische Aktivität hervorruft, etwa durch keine oder eine reduzierte CDC- und ADCC-Aktivität, beispielsweise weniger als 50%. Dieses Präparat kann zur pharmazeutischen und/oder diagnostischen Anwendung kommen. Auch wenn die Antikörper-Aktivitäten in dem erfindungsgemäßen Präparat reduziert sind, kann eine besonders gute Wirkung erzielt werden, wenn etwa durch eine Fragmentierung und/oder Derivatisierung die Halbwertszeit verlängert ist.

Ein mögliches Behandlungsziel ist die effektive Bindung und Reduktion von Tumorzellen, also Tumorgewebe oder Metastasen oder im Besonderen disseminierte Tumorzellen. Die Anzahl der in Blut, Knochenmark oder Organen detektierbaren Tumorzellen bzw. der Mikrometastasen soll signifikant reduziert werden. Die Bildung von Metastasen soll verzögert, deren Wachstum zumindest verlangsamt werden. Damit kann die rückfallsfreie Lebensspanne und damit auch die Gesamtüberlebenszeit der Patienten durch die gezielte Immuntherapie verlängert werden.

Im Rahmen der erfindungsgemäßen Verwendung, insbesondere der Behandlung zur Reduktion bzw. Inhibition des Wachstums von Tumorzellen in einem Krebspatienten ist eine Blutwäsche möglich. Es können aber auch Körperflüssigkeiten oder Gewebe, wie Haut oder andere Organe, die von einem Spender stammen, der mit einem Risiko einer Krebserkrankung behaftet ist, vorsorglich mit dem Antikörper gerichtet gegen eine Tumor-assoziierte Glykosilierung ex vivo behandelt werden. Ein mögliches Risiko einer Übertragung von Tumorzellen durch eine kontaminierte Spende wird minimiert.

Krebspatienten, die einer Hochdosischemotherapie unterzogen werden, sind oftmals Knochenmarkspender oder Spender von hämatogenen Stammzellen, die sie dann nach erfolgter Chemotherapie wieder zur Eigentherapie erhalten. Gerade dieses Material ist möglicherweise mit Tumorzellen kontaminiert und wird insbesondere für die erfindungsgemäße Behandlung herangezogen. Der Patient kann dann nach der Hochdosistherapie das erfindungsgemäß dekontaminierte Präparat erhalten.

Erfindungsgemäß wird also auch ein Verfahren zur Herstellung eines Präparates auf Basis einer Körperflüssigkeit oder Gewebe, zur Verfügung gestellt, welches die ex vivo Behandlung der Körperflüssigkeit oder des Gewebes mit einem Antikörper gerichtet gegen eine Tumor-assoziierte Glykosilierung zur Bildung eines zellulären Immunkomplexes, und gegebenenfalls das Abtrennen des Immunkomplexes vorsieht. Das erhältliche Präparat hat ein wesentlich reduziertes Risiko eines Tumorzellgehalts bzw. ein reduziertes Metastasenbildungspotential und ist vor allem durch einen reduzierten Gehalt an Rezeptoren der EGF-Rezeptor Familie

gekennzeichnet.

Das erfindungsgemäß ex vivo behandelte Material stammt insbesondere von Knochenmark, Blut, Serum oder Organbestandteile eines Patienten oder Spenders. Nach Behandlung mit dem spezifischen Antikörper wurde eventuell ein entsprechender Immunkomplex gebildet, der dann gegebenenfalls gemeinsam mit dem Material bzw. dem spezifischen Antikörper in einem verabreichungsfertigen Präparat umfasst ist. Falls das Material Tumorzellen enthält, werden diese nämlich von dem Antikörper erkannt und gebunden. Daraus resultiert ein zellulärer Immunkomplex des Antikörpers mit einer Tumorzelle oder mit zellulären Bestandteilen einer Tumorzelle. Dieser Immunkomplex kann zwar in dem Material verbleiben, wird aber vorzugsweise von dem Material abgetrennt. Dafür wird insbesondere ein fester oder flüssiger Träger verwendet, der den Immunkomplex lokalisiert. Durch die Abtrennung des Trägers von dem behandelten Material kann der Immunkomplex separiert werden. Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird der Antikörper bereits vor der Behandlung an einem festen Träger immobilisiert, die Körperflüssigkeit oder eine Spülflüssigkeit des Gewebes mit dem Träger inkubiert und die behandelte Flüssigkeit vom Träger getrennt.

Ein gleiches Verfahren eignet sich auch zur erfindungsgemäßen Bestimmung des Metastasenbildungspotentials in einer Probe eines Patienten. Erfindungsgemäß wird das Risiko der Metastasenbildung durch die qualitative und/oder quantitative Bestimmung von Tumorzellen als Maß für das Metastasenbildungspotential determiniert. Dabei wird eine Probe einer Körperflüssigkeit eines Krebspatienten bereitgestellt, die mit einem Antikörper gerichtet gegen eine Tumor-assoziierte Glykosilierung in Kontakt gebracht wird. Damit soll ein zellulärer Immunkomplex von potentiell vorhandenen Tumorzellen mit dem Antikörper gebildet werden, welcher qualitativ und/oder quantitativ bestimmt wird. Ein dafür bereitgestelltes diagnostisches Mittel enthält entweder den Antikörper in Kombination mit einem Träger zum Separieren eines zellulären Immunkomplexes, oder in Kombination mit einer Markierung zur Bestimmung eines zellulären Immunkomplexes. Der Antikörper wird vorzugsweise durch Konjugieren mit einem Enzym, einem radioaktiven Bestandteil oder einem anderen Detek-

tionsmittel markiert.

Erfindungsgemäß wird die Behandlung von Patienten mit Tumorzellen mit aberranter Glykosilierung möglich, etwa Tumorzellen mit einem Rezeptor aus der EGF-Rezeptorfamilie, oder Lewis y positive Tumorzellen. Die vorzugsweise behandelten Krebsarten sind epithelialer Krebs, wie Brustkrebs, Krebs des Magen und Darms, der Prostata, Pankreas, Ovarien und der Lunge, aber auch spezielle Arten der Leukämie. Patienten mit Primärtumoren können gleichermaßen behandelt werden wie Patienten mit Sekundärtumoren.

Die erfindungsgemäße Behandlung zur Immuntherapie von Krebspatienten erfolgt vorzugsweise nach der Resektion von Tumorgewebe bzw. nach erfolgter Chemotherapie. Bevorzugterweise wird die Behandlung innerhalb von 1 bis 2 Wochen nach Chemotherapie begonnen.

Erfindungsgemäß werden vor allem Antikörper eingesetzt, die gegen eine aberrante Glykosilierung von Tumorzellen und deren Rezeptoren für Wachstumsfaktoren gerichtet sind. Bevorzugte Antikörper sind aus der Gruppe von Antikörpern ausgewählt, die spezifisch sind für eine oder mehrere der Lewis x-, Lewis b- und Lewis y-Strukturen, gegebenenfalls deren sialylierte Formen, sowie GloboH, KH1, Tn-Antigen, Sialyl-Tn, TF-Antigen und alpha-1,3-Galactosyl-Epitop, aber auch Sialyl-Le^a oder Di-sialyl Le^a, Monosialosyl-Le I, Monosialosyl-Le II, Disialosyl-Le und Sialosyl Le.

Unter dem Begriff "Antikörper" werden Antikörper aller Art verstanden, insbesondere monospezifische oder polyspezifische, monoklonale Antikörper, oder auch chemisch, biochemisch oder molekularbiologisch hergestellte Antikörper.

Obwohl das Arzneimittel erfindungsgemäß einen nativen Antikörper enthalten kann, der eventuell aus einer Zelllinie, einem Organismus oder Patienten isoliert wurde, wird oftmals ein Antikörper-Derivat eingesetzt, welches an die aberrante Glykosilierung spezifisch binden kann. Das Antikörperderivat ist bevorzugt aus der Gruppe der Antikörper-Fragmente, -Konjugate oder Homologe,

aber auch Komplexe und Adsorbate ausgesucht. Es ist weiter bevorzugt, dass das Antikörper-Derivat zumindest Teilen des Fab-Fragmentes enthält, etwa gemeinsam mit zumindest Teilen des $F(ab')_2$ Fragmentes, und/oder Teilen der hinge Region und/oder des Fc-Teils eines lambda oder kappa Antikörpers. Weiter kann auch ein einkettiges Antikörper-Derivat, etwa ein sogenannter „single chain“ Antikörper in einem Impfstoff im Sinne der Erfindung herangezogen werden. Vorzugsweise wird ein Antikörper von der Art eines Immunglobulins, etwa eines IgG, IgM oder IgA, eingesetzt.

Die erfindungsgemäße Behandlung zielt spezifisch auf die Tumorzellen ab. Es werden daher keine Nebenwirkungen aufgrund von unspezifischen Wechselwirkungen erwartet. Es sollte daher keine unverhältnismäßigen Reaktionen hervorgerufen werden, auch der erfindungsgemäß verwendete Wirkstoff von einer nicht-humanen Spezies abgeleitet ist, wie etwa ein muriner Antikörper. Es wird jedoch angenommen, dass ein rekombinanter, chimärer, sowie ein mit menschlichen Bestandteilen kombinierter, humanisierter oder humaner Antikörper für die Verabreichung am Menschen besonders verträglich ist.

Die Bindung des Antikörpers an mindestens einen der Familie der EGF-Rezeptoren bzw. an mehrere oder alle Rezeptoren aus der Familie der EGF-Rezeptoren oder anderen glykosylierten Rezeptoren der Krebszelle, erfolgt üblicherweise mit hoher Affinität, bzw. hoher Avidität. Die Bindung der Wachstumsfaktoren bzw. Liganden an deren Rezeptoren wird nicht nur zur prophylaktischen Behandlung inhibiert oder verhindert. Die Wachstumsfaktoren bzw. Liganden können auch von deren Rezeptoren verdrängt werden. Dementsprechend wird eine therapeutische Behandlung des Tumorzellwachstums und von metastasierendem Krebs möglich. Die bevorzugte Affinität des Antikörpers liegt dabei unter einem K_d -Wert von 10^{-6} mol/l, vorzugsweise weniger als 10^{-7} mol/l, am meisten bevorzugt 10^{-8} mol/l oder weniger.

Der ausgewählte Antikörper interferiert mit der Bindung von Wachstumsfaktoren oder anderen Liganden an eine Tumorzelle, vorzugsweise in der Art, dass die Bindungsstelle für den Antikörper in der Nähe, überlappend mit oder gleich der Bindungsstelle für die Wachstumsfaktoren bzw. die Liganden ist.

Zur Bindung aller glykosylierten Rezeptoren einer Tumorzelle wird üblicherweise eine hohe Dosis von mindestens 50 mg, vorzugsweise mindestens 100 mg, am meisten bevorzugt mindestens 200 mg pro Patient verabreicht. Die maximale Dosis richtet sich nach der Verträglichkeit des Antikörpers, wobei humanisierte Antikörper bzw. humane Antikörper am besten verträglich sind. Eine Dosis bis zu 1 g oder in einigen Fällen bis zu 2 g pro Patient und Behandlung kann durchaus vorteilhaft sein. Die Behandlung wird vorzugsweise in bestimmten Zeitabständen wiederholt, entsprechend der Halbwertszeit des verwendeten Antikörpers, die üblicherweise im Bereich von 5 bis 30 Tagen liegt. Durch besondere Derivatisierung des Antikörpers ist es möglich, die Halbwertszeit auf bis zu mehreren Monaten zu verlängern und dadurch die Behandlungsintervalle entsprechend zu verlängern.

Das erfindungsgemäß verwendete Arzneimittel liegt vorteilhafterweise in einer geeigneten Formulierung vor. Bevorzugt sind solche Formulierungen mit einem pharmazeutisch akzeptablen Träger. Dieser umfasst beispielsweise Hilfsstoffe, Puffer, Salze und Konservierungsmittel. Vorzugsweise wird eine fertige Infusionslösung zur Verfügung gestellt. Nachdem ein Antikörper relativ stabil ist, haben Arzneimittel auf Basis von Antikörpern oder deren Derivate den wesentlichen Vorteil, dass sie als lagerstabile Lösung bzw. Formulierung in einer gebrauchsfertigen Form „ready-to-use“ in den Verkehr gebracht werden können. Diese ist bevorzugt bei Kühlschranktemperaturen bis zu Raumtemperatur in der Formulierung lagerstabil. Das erfindungsgemäß verwendete Arzneimittel kann aber auch in gefrorener oder lyophilisierter Form zur Verfügung gestellt werden, die bei Bedarf aufgetaut bzw. rekonstituiert werden kann.

Die Konzentration des Arzneimittelwirkstoffes richtet sich nach dessen Verträglichkeit. Dabei kann ein besonders verträgliches Präparat auf Basis eines humanisierten Antikörpers in hoher Konzentration direkt ohne weitere Verdünnung an den Patienten verabreicht werden. Durch die bevorzugte Konzentration im Bereich von 0.1% bis 10%, vorzugsweise von 1%-5%, ist es möglich das verabreichte Volumen und die entsprechende Infusionszeit gering zu halten.

Das Arzneimittel wird üblicherweise i.v. verabreicht. Gleichermaßen kann aber eine andere parenterale oder mucosale Verabreichungsart gewählt werden, die den Wirkstoff zur systemischen oder lokalen Anwendung am Ort des Tumors oder der Metastasen bringt.

Das folgende Beispiel sowie die Zeichnungsfiguren sollen die vorliegende Erfindung weiter erläutern, aber nicht einschränken:

Figur 1 zeigt die Hemmung der EGF- und Heregulin-beta-vermittelten Stimulierung der MAP-Kinase durch Antikörper (SKBR3 Zellen wurden durch Serumentzug in ihrem Wachstum arretiert; 15 Minuten vor der Stimulation wurden die Zellen mit den entsprechenden Antikörpern präinkubiert, nämlich mit IGN311 (mit IGN beschriftete Spuren), Anti-EGF-Rezeptor Antikörper (mit A beschriftete Spuren) und Herceptin (mit He beschriftete Spuren). Danach wurden die Zellen mit EGF (mit E beschriftete Spuren) und Heregulin-beta (mit H beschriftete Spuren) stimuliert; Spur U entspricht dem Leerwert (=unstimulierte Zellen)).

Figur 2 zeigt die Hitzelabilität der IGN311 induzierten Hemmung der MAP-Kinase Stimulation (IGN311 wurde durch Hitzedenaturierung (10 min bei 95°C) inaktiviert. Wachstumsarretierte SKBR3-Zellen wurden 15 min mit IGN311 (mit IGN beschriftete Spuren) bzw. mit hitzedenaturiertem IGN311 (mit IGN311* beschriftete Spuren) oder Anti-EGF-Rezeptor Antikörper (mit A beschriftete Spuren) präinkubiert. Danach wurden die Zellen mit EGF (mit E beschriftete Spuren) stimuliert; Spur U entspricht dem Leerwert (=unstimulierte Zellen)).

Beispiel: Inhibierung der Wachstumsfaktor-medierten Stimulierung durch den anti-Lewis Y-Antikörper IGN311

In einer Zellkultur einer Mammakarzinom-Tumorzelllinie SKBR3 wurde durch Serumentzug eine Quieszenz ausgelöst. Das basale Niveau der MAP-Kinase Phosphorylierung wurde dann durch kurzzeitige Inkubation mit den Wachstumsfaktoren EGF oder Heregulin deutlich gesteigert. Die Bestimmung der MAP-Kinase Phosphorylierung erfolgte mittels SDS-Elektrophorese des Zelllysats,

Transfer der Banden auf Nitrozellulose und Immunblotting mit einem Antikörper, der gegen die dual phosphorylierte MAP-Kinase erk1 (p44) und erk2(p42) gerichtet ist.

Durch die Inkubation der Zellkultur mit spezifischen Antikörpern konnte der Effekt der Wachstumsfaktoren signifikant antagonisiert werden. In den Studien wurde ein anti-Lewis Y-Antikörper, IGN311, hergestellt gemäß der EP 0 528 767, mit einem murinen, monoklonalen anti-EGF-Rezeptorantikörper und Herceptin (Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland), einem Antikörper gegen den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (HER2-Protein) als Positivkontrollen verglichen.

Figur 1 zeigt, dass

- (i) der Anti-EGF-Rezeptor Antikörper (mit „A“ beschriftete Spuren) den Effekt von EGF und Heregulin deutlich unterdrückt (Positivkontrolle),
- (ii) IGN311 (mit „IGN“ beschriftete Spuren) den Effekt von EGF und Heregulin zum Teil blockiert, und
- (iii) Der Effekt von Herceptin (mit „He“ beschriftete Spuren) geringer ist als der von IGN311.

Um auszuschließen, dass die hemmende Wirkung von IGN311 auf eine Kontamination mit einer niedermolekularen Substanz oder einem Metabolit im Kulturüberstand zurückzuführen ist, wurde IGN311 hitzedenaturiert. Figur 2 zeigt, dass natives IGN311 die Wirkung von EGF unterdrückt, denaturiertes IGN311 hingegen nicht. Eine Erhöhung der Konzentration von IGN311 führte zu einer dem Anti-EGF-Rezeptor Antikörper vergleichbaren Wirkung.

IGN311 konnte in reproduzierbarer Weise die Aktivierung der MAP-Kinase durch EGF in SKBR3 Zellen hemmen. Dieser Effekt ist spezifisch und wurde durch Hitzedenaturierung des Antikörpers beseitigt.

Patentansprüche:

1. Verwendung eines Präparates auf Basis eines Antikörpers gerichtet gegen eine Tumor-assoziierte Glykosilierung zur Herstellung eines Arzneimittels zur prophylaktischen und/oder therapeutischen Behandlung zur Reduktion bzw. Inhibition des Wachstums von Tumorzellen in einem Krebspatienten.
2. Verwendung nach Anspruch 1 zur Behandlung eines Patienten in Kombination mit einer Chemotherapie.
3. Verwendung nach Anspruch 1 zur Behandlung einer Chemotherapie-Resistenz.
4. Verwendung nach Anspruch 1 zur Behandlung der „minimal residual disease“.
5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Inhibition von glykosilierten Tumorzell-Rezeptoren.
6. Verwendung nach Anspruch 5 zur Verhinderung der mitogenen Stimulierung einer Tumorzelle durch den epidermalen Wachstumsfaktor („epidermal growth factor“, EGF) und/oder Heregulin.
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Lyse von Tumorzellen, die einen Rezeptor aus der Familie der EGF-Rezeptoren exprimieren.
8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass ein Antikörper gerichtet gegen eine aberrante Glykosilierung verwendet wird, ausgesucht aus der Gruppe von Lewis x-, Lewis b- und Lewis y-Strukturen, sowie Sialyl-tn, Tn-Antigen, GloboH, KH1, TF-Antigen und alpha-1,3-Galactosyl-Epitop.
9. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass der Antikörper ein monoklonaler Antikörper ist, insbesondere ein humaner, humanisierter, chimärer oder muriner Antikörper.

10. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass ein Antikörper mit einer Affinität zur Bindung des EGF-Rezeptors mit einer Dissoziationskonstante unter einem Kd-Wert von 10^{-6} mol/l, vorzugsweise weniger als 10^{-7} mol/l, am meisten bevorzugt 10^{-8} mol/l oder weniger verwendet wird.

11. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass der Antikörper in einer Dosis von mindestens 50 mg, vorzugsweise mindestens 100 mg, am meisten bevorzugt mindestens 200 mg, bis zu 2 g pro Patient, verwendet wird.

12. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass ein Antikörperderivat verwendet wird, der mindestens den Fab-Teil eines Antikörpers enthält und an eine Tumor- assoziierte Glykosilierung bindet.

13. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass der Patient an Krebs mit Tumorzellen, die einen Rezeptor aus der Familie der EGF-Rezeptoren exprimieren, leidet.

14. Pharmazeutisches Präparat zur Behandlung von Krebspatienten, enthaltend einen Antikörper gerichtet gegen eine Tumor-assozierte Glykosilierung in einer Konzentration im Bereich von 0.1-10%, vorzugsweise 1-5%.

15. Präparat zur pharmazeutischen und/oder diagnostischen Verwendung auf Basis eines Antikörperderivates mit mindestens einen Fab-Teil eines Antikörpers, der an eine Tumor-assozierte Glykosilierung bindet und eine CDC- und ADCC- Aktivität von weniger als 50% des nativen Antikörpers aufweist.

16. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass eine Körperflüssigkeit oder Gewebe eines Krebspatienten ex vivo behandelt wird, insbesondere Knochenmark, Blut, Serum oder Organbestandteile.

17. Verwendung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass der Krebspatient im Rahmen einer Hochdosischemotherapie behan-

delt wird.

18. Verwendung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Körperflüssigkeit bzw. das Gewebe von einem Patienten stammt, mit dem Risiko einer Krebskrankheit.

19. Verfahren zur Herstellung eines Präparates auf Basis einer Körperflüssigkeit oder Gewebe, insbesondere Knochenmark, Blut, Serum oder Organbestandteile durch

- ex vivo Behandlung der Körperflüssigkeit oder des Gewebes mit einem Antikörper gerichtet gegen eine Tumor-assoziierte Glykosilierung zur Bildung eines zellulären Immunkomplexes und
- gegebenenfalls Abtrennen des Immunkomplexes.

20. Präparat erhältlich nach einem Verfahren nach Anspruch 19, mit einem reduzierten Gehalt an Rezeptoren der EGF-Rezeptor Familie.

21. Verfahren zur Bestimmung des Risikos der Metastasenbildung in einem Krebspatienten durch

- Bereitstellen einer Probe einer Körperflüssigkeit eines Krebspatienten,
- In Kontakt bringen der Probe mit einem Antikörper gerichtet gegen eine Tumor-assoziierte Glykosilierung zur Bildung eines zellulären Immunkomplexes von potentiell vorhandenen Tumorzellen mit dem Antikörper und
- qualitative und/oder quantitative Bestimmung des Immunkomplexes in der Körperflüssigkeit als Maß für das Metastasenbildungspotential.

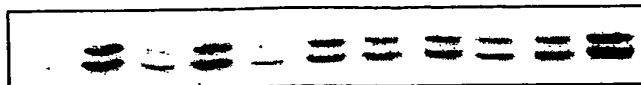
22. Diagnostisches Mittel enthaltend einen Antikörper gerichtet gegen eine Tumor-assoziierte Glykosilierung in Kombination mit einem Träger zum Separieren eines zellulären Immunkomplexes.

23. Diagnostisches Mittel enthaltend einen Antikörper gerichtet gegen eine Tumor-assoziierte Glykosilierung in Kombination mit einer Markierung zur Bestimmung eines zellulären Immunkomplexes.

Zusammenfassung:

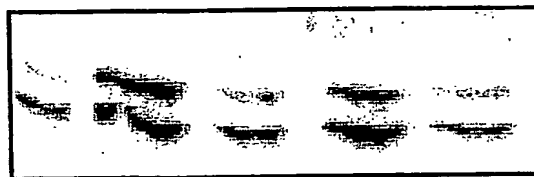
Die Erfindung betrifft die Verwendung eines Präparates auf Basis eines Antikörpers gerichtet gegen eine Tumor-assoziierte Glykosilierung zur Herstellung eines Arzneimittels zur prophylaktischen und/oder therapeutischen Behandlung zur Reduktion bzw. Inhibition des Wachstums von Tumorzellen in einem Krebspatienten, sowie ein pharmazeutisches Präparat enthaltend einen Antikörper gerichtet gegen eine Tumor-assoziierte Glykosilierung. Weiter betrifft die Erfindung ein Präparat zur pharmazeutischen und/oder diagnostischen Verwendung, ein diagnostisches Verfahren und Mittel zur Bestimmung des Risikos der Metastasenbildung in einem Krebspatienten sowie ein Verfahren zur Herstellung eines Präparates auf Basis einer Körperflüssigkeit oder Gewebe, jeweils unter Verwendung des Antikörper gerichtet gegen eine Tumor-assoziierte Glykosilierung.

SKBR3



U E E H H E E H H A E
A A He IGN He IGN

Fig.1



U E E E E
IGN IGN* A

Fig.2

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.